

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
13 décembre 2001 (13.12.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/93906 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
A61K 39/39, A61P 31/04, 33/00, 37/04

F-59130 Lambersart (FR). RIVEAU, Gilles [FR/FR]; 15,  
rue Jean-Baptiste Lebas, F-59133 Phalempin (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/01769

(74) Mandataires : LAZARD, Florence Ernest Gut-  
mann-Yves Plasseraud S.A. etc.; 3, rue Chauveau-La-  
garde, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 7 juin 2001 (07.06.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00/07302 7 juin 2000 (07.06.2000) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : IN-  
STITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; 1, rue du Pro-  
fesseur Calmette, F-59019 Lille Cedex (FR). INSTITUT  
NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE  
MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris  
(FR).

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : CAPRON,  
André [FR/FR]; 58, rue Capitaine Jasmin, F-59133  
Phalempin (FR). LOCHT, Camille [BE/BE]; 160, avenue  
Jacques Pasteur, B-1180 Bruxelles (BE). MENOZZI,  
Franco [IT/BE]; 29, rue des Canadiens, B-7022  
Mons-Hyon (BE). POULAIN-GODEFROY, Odile  
[FR/FR]; 11, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny,

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: ADJUVANT COMPOSITION COMPRISING FHA PROTEIN OR FRAGMENT OF FHA PROTEIN IN FREE FORM

(54) Titre : COMPOSITION ADJUVANTE COMPRENANT LA PROTEINE FHA OU UN FRAGMENT DE LA PROTEINE  
FHA SOUS FORME LIBRE

(57) Abstract: The invention concerns the use of the FHA protein or part of the FHA protein, in free form, as adjuvant of the  
immune response or as immunostimulant in a human or an animal. The invention also concerns adjuvant and immunostimulatory  
compositions comprising FHA protein or a fragment thereof, and the use of said compositions for making vaccines.

(57) Abrégé : La présente invention porte sur l'utilisation, d'une part, de la protéine FHA ou d'une partie de la protéine FHA,  
sous forme libre, comme adjuvant de la réponse immunitaire ou comme immunostimulant chez l'homme ou l'animal. Elle porte  
également sur des compositions adjuvantes et immunostimulantes comprenant la FHA ou un fragment de celle-ci, et l'application  
de ces compositions à la fabrication de vaccins.

WO 01/93906 A1

COMPOSITION ADJUVANTE COMPRENANT LA PROTEINE FHA OU UN FRAGMENT DE LA  
PROTEINE FHA SOUS FORME LIBRE

5

La présente invention se situe dans le domaine des adjuvants pour la vaccination et plus particulièrement des adjuvants permettant aussi bien la stimulation de l'immunité par voie mucosale que systémique.

10

La présente invention concerne toute utilisation de la protéine FHA ou une partie de la protéine FHA, sous forme libre, pour la préparation d'une composition adjuvante de la réponse immunitaire à usage humain ou animal.

15

Elle est également relative à toute composition adjuvante de la réponse immunitaire comprenant la protéine FHA ou une partie de la protéine FHA, sous forme libre.

Elle a en outre pour objet des compositions immunogènes et/ou vaccinales comprenant une telle composition adjuvante en association avec un immunogène ou avec un antigène.

20

L'hémagglutinine filamenteuse (FHA) de *Bordetella pertussis* est une adhésine majeure produite et sécrétée par la bactérie. Le gène de structure de la FHA code pour une protéine de 367 KDa, et la forme mature est constituée des 60 % N-terminaux de ce précurseur (références 1 à 5).

25

Les fonctions des parties N-terminale et C-terminale du précurseur (fhaB) et celle de la protéine mature sécrétée (FHA) sont décrites dans Geneviève Renaud – Mongénie et al (6). Il apparaît que le domaine N-terminal de fhaB joue un rôle essentiel dans la sécrétion de la protéine mature puisqu'une délétion en phase de cette région semble totalement inhiber ladite sécrétion.

A l'état mature, la protéine FHA a un poids moléculaire de 220 kDa et présente au moins trois sites de liaison caractérisés (1) :

- un site de liaison aux carbohydrates qui permet sa fixation aux cellules épithéliales ciliées,

5                   - un site de liaison à l'héparine et aux carbohydrates sulfatés impliqués dans l'attachement aux cellules épithéliales non ciliées et à la matrice extra-cellulaire ;

- une séquence RGD qui permet l'attachement aux macrophages par l'intermédiaire de leurs intégrines.

10               La FHA est une adhésine produite par différentes souches de *Bordetella*. On peut citer notamment les adhésines filamenteuses produites par *Bordetella bronchiseptica* et *Bordetella parapertussis*. Ces différentes FHA de *Bordetella* présentent un pourcentage d'homologie d'au moins 60 % avec la séquence de la FHA de *Bordetella pertussis*. En outre, la région N-terminale  
15 de la FHA présente de fortes similarités de séquences avec les domaines N-terminaux de *S. marcescens* ou de *P. mirabilis* (4).

Dans l'ensemble de ce texte, toute hémagglutinine filamenteuse ayant au moins 60 % d'homologie des séquences avec la FHA de *B. pertussis*, ou tout polypeptide ayant une homologie de séquences d'au moins 60 % et de  
20 préférence 70 % avec la FHA de *B. pertussis* doit être considéré comme un équivalent fonctionnel de la FHA de *B. pertussis*.

Les propriétés d'adhérence de la FHA à différents types cellulaires, comme les cellules épithéliales ciliées et non ciliées ou encore les monocytes/macrophages ont été mises à profit dans l'état de la technique afin  
25 de cibler la présentation d'un antigène d'intérêt vers ces cellules qui peuvent être responsables de la présentation de l'antigène au système immunitaire, le cas échéant après maturation.

Plus particulièrement, les propriétés des hémagglutinines filamenteuses de *Bordetella* de se fixer aux cellules épithéliales non ciliées et

à la matrice extra-cellulaire permettent d'envisager un ciblage vers les muqueuses.

L'immunisation par voie muqueuse offre des avantages certains par rapport à une immunisation par voie parentérale. D'une part, une immunisation par voie muqueuse permet une stimulation simultanée de l'immunité muqueuse et de l'immunité systémique, ce qui n'est pas le cas de la voie systémique. D'autre part, la voie muqueuse est une voie d'administration qui provoque peu d'effets secondaires. Enfin, le développement de vaccins adaptés aux exigences des pays en voie de développement passera certainement par une administration par voie muqueuse. Cependant, la plupart des antigènes sont faiblement immunogènes quand ils sont administrés par voie muqueuse, probablement parce que leur interaction avec le système immunitaire muqueux est faible. Différentes stratégies ont été développées pour augmenter l'immunogénicité des antigènes administrés par cette voie, d'une part en favorisant leur accès à la muqueuse, d'autre part en utilisant des processus capables d'augmenter la réponse obtenue.

L'accès à la muqueuse est favorisé par des antigènes de type particulière dont l'interaction avec les tissus lymphoïdes est facilitée. Les formes particulières les plus classiquement développées sont de plusieurs types : liposomes (7), microsphères (8), ISCOMs (9). Ce sont tous des structures globulaires synthétiques qui encapsulent l'antigène à administrer et dont la composition et leur mode de fabrication diffèrent selon leur nature (lipides pour les liposomes, polymères organiques pour les microsphères, mélange de lipides et de Quil A pour les ISCOMs). Une autre approche consiste à utiliser des microorganismes recombinants exprimant l'antigène d'intérêt. Ces microorganismes peuvent être vivants ou inactivés, et ils sont utilisés comme vecteur amenant l'antigène au niveau du système immunitaire sous-jacent des muqueuses. Ainsi, les Salmonelles ont été utilisées comme vecteur vivant pour initier une immunisation par voie orale. Un vecteur vivant

adapté à l'immunisation par le tractus respiratoire a été réalisé grâce au développement de souches recombinantes de *Bordetella pertussis*. Ces stratégies utilisant des vaccins vivants présentent en outre l'intérêt de permettre une exposition prolongée de l'antigène aux muqueuses de l'hôte lors de la colonisation et ne nécessitent donc pas l'emploi d'adjuvants.

Le développement d'adjuvants efficaces par voie muqueuse s'est fait dans un premier temps en testant les adjuvants qui avaient prouvé leur efficacité par voie parentérale, comme les composés de la famille de muramyl-peptides. Les adjuvants muqueux les plus efficaces à ce jour restent les toxines bactériennes telles que la toxine cholérique, la toxine de *E. coli*, et pour un moindre développement la toxine pertussique. Un des problèmes majeurs de l'utilisation de ces toxines comme adjuvants muqueux est leur toxicité et de nombreux auteurs ont cherché à construire des mutants de ces toxines dépourvus d'activité toxique mais ayant conservé une activité adjuvante. Il existe cependant encore un réel besoin d'adjuvants muqueux efficaces et sans effets secondaires.

Les inventeurs ont cherché dans une première approche à augmenter l'adhérence des liposomes aux muqueuses, et par cela même de limiter les quantités d'antigène nécessaires à une immunisation efficace, en couplant l'antigène des préparations liposomales à la FHA. L'addition de FHA à des liposomes contenant un antigène tel que la Sm 28 GST de *Schistosoma mansoni* permet d'augmenter la réponse immune obtenue par voie nasale contre cet antigène. L'explication immédiate de ce résultat était, compte tenu des propriétés d'adhérence de la FHA, que cette dernière permet une meilleure adhérence des liposomes aux surfaces mucosales et permet ainsi de faciliter leur accès aux cellules du système immunitaire. C'est ce concept qui a été validé dans le brevet WO 98/16553, où Mielcarek et al décrivent des constructions hybrides entre tout ou partie de la FHA et tout ou partie d'une protéine antigénique hétérologue vis-à-vis de la FHA. Les résultats



expérimentaux qui y sont décrits conduisent à l'hypothèse que la réponse  
immune obtenue à l'égard de la protéine hétérologue résulte du fait que la  
FHA permet une meilleure adhésion des liposomes aux surfaces muqueuses  
C'est sur ces caractéristiques fonctionnelles que la demande de brevet supra  
5 décrit effectivement l'utilisation de la FHA comme molécule de ciblage en  
surface des différents vecteurs vaccinaux (liposomes, microsphères, etc.) pour  
augmenter la réponse immune induite par l'utilisation de liposomes.

Les protéines hybrides entre la FHA et la glutathion S-transférase  
de *Schistosoma mansoni* (Sm 28 GST) permettaient l'obtention d'une réponse  
10 immune vis-à-vis de la Sm 28 GST et protectrice vis-à-vis de l'infection par  
*Schistosoma mansoni* (12).

Les auteurs ont précisé que l'ajout de FHA à des liposomes déjà  
fabriqués avec l'antigène d'intérêt seul a donné des résultats satisfaisants ;  
autrement dit, la FHA qui possède des séquences hydrophobes qui lui  
15 permettent de s'insérer facilement dans les liposomes et des séquences  
hydrophiles, présentant des propriétés d'adhésine de la FHA permet à la fois  
le ciblage des cellules immuno-compétentes, et des différents sites du tractus  
respiratoire.

Les auteurs en déduisent qu'il est possible et suggéré d'utiliser  
20 d'autres vecteurs synthétiques du même type, par exemple des vecteurs  
portant, outre la FHA, plusieurs antigènes différents pour la réalisation de  
formulations vaccinales multi-antigéniques.

L'ensemble de ce qui précède indique que la FHA était utilisée pour  
ses propriétés de ciblage.

25 De manière surprenante, il a été montré selon la présente invention,  
que la protéine FHA, ou encore un polypeptide comprenant un fragment de la  
protéine FHA seule ou incluse dans une composition, est capable d'induire ou  
d'augmenter une réponse immunitaire à l'encontre d'un immunogène ou à  
l'encontre d'un antigène d'intérêt lorsque la FHA est présentée sous une forme

libre, c'est-à-dire non physiquement liée à l'antigène d'intérêt contre lequel la réponse immunitaire est recherchée. Cela n'exclut pas une liaison physique avec toute molécule ou structure soit non antigénique, soit pour laquelle une éventuelle réponse immunitaire est indépendante de la réponse recherchée, par exemple dans le cadre d'une vaccination.

"Physiquement liée" signifie que la FHA ou son équivalent fonctionnel ne peuvent être administrés séparément de l'antigène d'intérêt. Cela inclut donc tout type de lien direct ou indirect avec un antigène d'intérêt. Par liaison directe, il est entendu que l'antigène d'intérêt et la FHA ou le fragment de la FHA sont liés par liaison covalente ou non covalente, mais sans intervention de substances, vecteurs, ou particules. Par liaison indirecte, il est au contraire entendu tout type d'association et/ou de liaison de la FHA ou du fragment de la FHA, de l'antigène d'intérêt avec une molécule, un vecteur, ou une structure quelconque ; lesdites molécule, vecteur ou structure peuvent comprendre, sans être limitatifs, des molécules transporteuses telle que la sérum albumine, des structures lipidiques tels des liposomes, des nanoparticules, des microsphères, des ISCOMs etc. Des liaisons indirectes peuvent également être réalisées par l'intermédiaire de liaisons covalentes, de liaisons électro-statiques ou des liaisons de type hydrophobe.

Un moyen de différencier la notion de "physiquement liée" à celle de "forme libre" qui caractérise les adjuvants de l'invention est la capacité des différents éléments de l'association (antigène d'intérêt, FHA ou fragment de la FHA, le cas échéant vecteur ou véhicule pharmaceutique) d'être séparés par des méthodes usuelles de séparation, telles la chromatographie, ou l'électrophorèse.

Il a ainsi été démontré selon l'invention, qu'une composition contenant un antigène d'intérêt et, sous forme non physiquement liée à ce dernier, la FHA était capable d'induire la production d'anticorps sériques ainsi que la production au niveau des muqueuses d'anticorps spécifiques de cet

antigène ou immunogène. Dans la composition selon l'invention, la FHA n'est pas physiquement liée au sens défini ci-dessus aux autres composés ou substances de la composition.

5 Les compositions selon l'invention sont immunogènes vis à vis de l'antigène contenu dans celle-ci et non vis-à-vis de la FHA.

Le demandeur a aussi montré que, de manière surprenante, la protéine FHA possédait en tant que telle une activité adjuvante de la réponse immunitaire, lorsqu'elle est présentée sous une forme libre, c'est-à-dire non physiquement liée à l'antigène d'intérêt contre lequel la réponse immunitaire  
10 est recherchée.

Par composé adjuvant au sens de la présente invention, on entendra un composé apte à induire ou à augmenter la réponse immunitaire spécifique vis-à-vis d'un antigène ou d'un immunogène, ladite réponse immunitaire consistant indifféremment en une réponse humorale et/ou  
15 cellulaire. Cette réponse immunitaire consiste généralement en une stimulation de la synthèse d'immunoglobulines spécifiques d'un antigène donné, en particulier des IgG, IgA, IgM.

De façon encore plus surprenante, il a été démontré que cette activité adjuvante se manifestait avec efficacité lors des administrations des  
20 compositions par voie mucosale.

Un premier objet de l'invention consiste donc en l'utilisation de la protéine FHA telle que définie plus haut, sous forme libre, pour la préparation d'une composition adjuvante de la réponse immunitaire.

Toute protéine, telle que la FHA de B. bronchiseptica ou celle de B. parapertussis qui présente au moins 70 % de similarité avec la FHA de B. pertussis peut également être utilisée pour la préparation d'une composition adjuvante et fait partie de l'invention.  
25

Dans l'ensemble du texte, on entend par X% de similarité par rapport à une séquence de référence le fait que X % des acides aminés sont



identiques ou modifiés par substitution conservative telle que définie dans le logiciel d'alignement des séquences d'acides aminés ClustalW (<http://bioweb.pasteur.fr/docs/doc-gensoft/clustalw/>) et que (100-X) % peuvent être délévés, substitués par d'autres amino-acides, ou encore que  
5 (100-X) % peuvent être ajoutés à la séquence de référence.

Ces protéine sont considérées dans le présent texte comme des équivalents fonctionnels de la FHA quant aux propriétés adjuvantes de cette dernière.

Selon un autre aspect, l'invention concerne une composition  
10 adjuvante de la réponse immunitaire comprenant la protéine FHA ou un équivalent fonctionnel de celle-ci, sous forme libre. Une telle composition adjuvante pourra être administrée à l'homme ou à l'animal simultanément ou séquentiellement à l'antigène d'intérêt à l'encontre duquel une réponse immunitaire est recherchée. Avantageusement, la composition adjuvante selon  
15 l'invention sera administrée simultanément à l'antigène d'intérêt. Elle peut également faire l'objet de plusieurs administrations, seule ou en association avec l'antigène ; en particulier, elle peut faire l'objet d'un traitement de rappel consécutif à une immunisation.

Cette activité adjuvante se manifeste non seulement lorsque  
20 l'adjuvant et l'antigène sont administrés conjointement dans une même composition, mais également quand l'antigène et l'adjuvant sont administrés de façon séparée dans le temps, soit par la même voie d'administration, soit par deux voies différentes. A titre d'exemple, l'antigène peut être administré par voie systémique et l'adjuvant par voie mucosale ou orale. De la même  
25 façon, le nombre d'administrations peut différer pour l'antigène et l'adjuvant. Selon l'antigène et la réponse immunitaire choisis, l'adjuvant peut être administré une seule fois et l'antigène plusieurs fois, ou l'inverse.

L'invention est également relative à une composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend une composition adjuvante décrite

ci-dessus, en association avec une molécule immunogène ou avec un antigène, la molécule immunogène ou l'antigène n'étant pas physiquement liée avec la protéine FHA ou le fragment de la protéine FHA présente dans la composition adjuvante.

5            Par antigène au sens de la présente invention, on entendra toute molécule ou structure naturelle ou synthétique, quelle que soit sa nature (protéique, saccharidique ou encore lipidique etc.) reconnue par les cellules du système immunitaire et capable d'activer celles-ci de manière à induire une réponse immunitaire spécifique de cet antigène.

10           On entend par immunogène au sens de l'invention toute composition qui induit une réponse immunitaire forte, particulièrement dans un contexte d'une protection immunitaire contre des organismes pathogènes porteurs dudit antigène.

15           Il a ainsi été montré selon la présente invention, que la protéine FHA se comportait en tant que composé adjuvant capable d'initier ou d'accroître la réponse immunitaire à l'encontre de différents antigènes ou immunogènes de structures diverses, reconnues différemment par les cellules du système immunitaire.

20           L'objectif de l'addition d'un adjuvant à un antigène dans une composition est de provoquer ou stimuler la réponse immunitaire tant dans ses phases primaires (production d'IgM) que dans ses phases secondaires à savoir la production des IgG au niveau de l'immunité cellulaire systémique, ou des IgA au niveau de l'immunité mucosale. Celle-ci est particulièrement importante dans le cas de développement d'une immunité anti-infectieuse. En  
25           effet, l'adhérence des micro-organismes aux membranes des cellules épithéliales des muqueuses est la première étape de l'infection virale et de la colonisation bactérienne. Les anticorps de type IgA peuvent empêcher cette adhérence en recouvrant le micro-organisme (coating). Ils offrent ainsi une protection au niveau des sécrétions externes comme les larmes, la salive ou

les sécrétions nasales ainsi qu'au niveau du mucus intestinal et pulmonaire. Il est donc facile de concevoir que si la FHA selon l'invention produisent une stimulation de la réponse IgA, l'impact sur la mise au point de compositions immunogènes ou de vaccins est important.

5           Ainsi, une composition immunogène comprenant l'adjuvant selon l'invention et un immunogène ou un antigène est caractérisée en ce que le rapport en poids de l'adjuvant et de l'immunogène est compris entre  $10^{-4}$  et  $10^4$ , de préférence entre 0,03 et 300 et de manière préférée entre 0,4 et 5.

10           Comme il a été dit plus haut, et démontré ci-après, l'adjuvant est administrable séparément de l'antigène dans le temps ou selon différentes voies d'administration, ou associés dans une composition immunogène.

Dans l'un et l'autre cas, l'antigène peut être d'origine bactérienne, virale ou parasitaire. Il peut également s'agir d'un antigène spécifique de cellules cancéreuses, tel l'antigène de carcinome embryonnaire (ACE).

15           Quand l'antigène est d'origine bactérienne, il peut s'agir notamment d'antigènes de *Bordetella*, de *Shigella*, de *Neisseria*, de *Borrelia*, des toxines ou toxoïdes diphtériques, tétaniques ou cholériques.

Quand il est d'origine parasitaire, il peut par exemple être un antigène de *Plasmodium*, des *Schistosoma* ou de *Toxoplasma*.

20           Un autre objet de l'invention consiste en une composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend une composition adjuvante telle que décrite ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement compatible.

25           La préparation de compositions vaccinales contenant un polypeptide en tant que molécule immunogène ou antigénique est bien connue de l'homme du métier et est en particulier illustrée dans les brevets US N°4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792 et 4,578,770, dont le contenu est incorporé ici par référence.

De telles compositions vaccinales sont préparées sous la forme de solutions liquides ou de suspensions injectables ou encore sous une forme solide, par exemple lyophilisée, adaptée à la mise en solution préalablement à l'injection. La FHA ou la partie de la FHA utilisée comme adjuvant ainsi que l'antigène ou l'immunogène seront en général mélangés à des excipients pharmaceutiquement compatibles, tels que de l'eau, un tampon salin, du dextrose, du glycérol, de l'éthanol, ou des mélanges de ces derniers.

Une composition vaccinale selon l'invention peut également contenir de faibles quantités de substances auxiliaires telles que des agents mouillants ou émulsifiants, ou encore des agents tampons.

Les compositions vaccinales selon l'invention sont formulées de telle manière à les adapter à une administration par voie nasale, par voie orale, par voie sous-cutanée, intradermique, intramusculaire, vaginale, rectale, oculaire ou auriculaire.

Le choix des substances auxiliaires sera guidé par le mode d'administration choisi. Un mode d'administration préféré sera l'administration nasale ou orale.

La FHA et l'antigène d'intérêt peuvent être formulés, au sein d'une composition vaccinale selon l'invention, sous une forme neutre ou saline.

Des sels pharmaceutiquement compatibles comprennent des sels d'addition acide (formés avec les groupes amino libres du peptide) ou encore ceux formés avec des acides inorganiques tels que par exemple les acides chlorhydrique et phosphorique ou encore ceux formés avec des acides organiques tels que l'acide acétique, oxalique, tartrique et mandélique.

Des sels formés avec les groupes carboxy libres peuvent également être dérivés de bases inorganiques telles que par exemple des hydroxydes de sodium, potassium, ammonium, calcium ou ferrique, ou encore ceux formés avec des bases organiques telles que l'isopropylamine, la triméthylamine, le 2-éthylaminoéthanol, l'histidine, ou encore la procaine.

Une composition vaccinale selon l'invention comprend une quantité d'adjuvant et d'antigène efficace du point de vue immunogène et/ou thérapeutique. Les quantités respectives d'adjuvant et d'antigène dépendront de l'individu à traiter, c'est-à-dire de la capacité du système immunitaire de l'individu considéré à développer une réponse immune, ainsi que du degré de protection requis.

Avantageusement, une composition vaccinale selon l'invention comprendra une dose de FHA ou d'un équivalent fonctionnel comprise entre 0,1 et 1000  $\mu\text{g}$ , avantageusement entre 10 et 300  $\mu\text{g}$ , et de manière tout à fait préférée entre 20 et 150  $\mu\text{g}$ .

La quantité d'immunogène ou d'antigène incluse dans une composition vaccinale selon l'invention dépendra à la fois de l'individu à traiter, du type et de la nature de l'antigène d'intérêt.

A titre illustratif, une composition vaccinale selon l'invention comprendra de 0,1 à 1000  $\mu\text{g}$  d'antigène ou d'immunogène, de préférence de 1 à 300  $\mu\text{g}$  et de manière tout à fait préférée de 10 à 50  $\mu\text{g}$  d'antigène ou d'immunogène.

De manière préférée, une composition vaccinale selon l'invention sera administrée une première fois, puis un rappel sera réalisé quelques mois après l'administration initiale.

La quantité de FHA, ou d'un équivalent fonctionnel, et d'antigène inclus dans une composition vaccinale selon l'invention peuvent être adaptées pour l'obtention d'une bonne réponse immunitaire, par exemple en suivant la prolifération in vitro de lymphocytes du sang périphérique (PBL) cultivés en présence de l'antigène ou de l'immunogène, et tout particulièrement en mesurant les niveaux de cytokines sécrétées par les lymphocytes immuns, ou en évaluant les titres en anticorps de type sérique et/ou mucosal produits.

De tels tests peuvent être réalisés en utilisant des marqueurs classiques tels que des marqueurs isotopiques, ou encore des marqueurs non-radioactifs tels que des enzymes ou des molécules fluorescentes,

5 De telles techniques sont bien connues de l'homme du métier et sont notamment décrites dans les brevets US N° 3,791,932; 4,174,384 et 3,949,064, ces brevets étant ici incorporés par référence.

Les titres en anticorps de type sérique et/ou mucosal peuvent être mesurés comme indiqué dans les exemples 1 à 3 ci-après.

10 Selon un mode particulier de réalisation des compositions vaccinales selon l'invention, de telles compositions comprendront, outre une quantité adjuvante efficace d'une protéine FHA ou d'un équivalent fonctionnel, une quantité immunologiquement efficace d'au moins deux antigènes ou immunogènes, par exemple de trois à vingt antigènes ou immunogènes différents, et de manière préférée de trois à dix antigènes ou immunogènes  
15 différents.

La présente invention porte enfin sur une méthode de vaccination ou de stimulation de l'immunité cellulaire et humorale consistant à utiliser comme adjuvant de vaccination et/ou de stimulation de l'immunité la FHA ou un équivalent fonctionnel de celle-ci tels que définis plus haut. Un tel adjuvant  
20 est administré dans une composition sous forme libre c'est-à-dire non physiquement liée à l'antigène ou aux antigènes pour lesquels l'on souhaite stimuler une réponse immunitaire.

L'antigène ou les antigènes contre lesquels on souhaite obtenir une réponse sont administrés seuls, ou en association avec l'adjuvant, sans  
25 toutefois être liés physiquement à ce dernier. Ces compositions peuvent contenir en outre des éléments de formulation adaptés à l'administration choisie.

Dans cette méthode selon l'invention, l'adjuvant, le ou les antigènes peuvent être également être administrés de façon simultanée mais dans des



compositions différentes, ou séquentiellement dans le temps. En particulier, la composition selon l'invention peut être administrée ultérieurement à une première vaccination ou un premier traitement, afin de réactiver la réponse immunitaire contre l'antigène ou les antigènes.

5

Selon un autre aspect de l'invention, la FHA ou un équivalent fonctionnel de celle-ci est utilisable comme principe actif dans la préparation d'une composition immunostimulante.

10 Par immunostimulant(e), on entend la propriété de stimuler les immunoglobulines totales, notamment les IgG ou les IgA totales. Il s'agit d'une réponse polyvalente non spécifique ; cette propriété se différencie de celle d'adjuvant pour laquelle seules les immunoglobulines spécifiques d'un antigène donné sont stimulées ; cette propriété se distingue également de celle d'un immunogène, tel un vaccin, dans lequel la production des  
15 immunoglobulines spécifiques d'un antigène donné est stimulée.

L'invention porte ainsi sur une composition immunostimulante contenant comme principe actif la FHA ou un équivalent fonctionnel de celle-ci et un véhicule pharmaceutique compatible avec une administration à l'homme ou à l'animal.

20

La composition immunostimulante selon l'invention peut être avantageusement utilisée pour renforcer les défenses immunitaires d'un organisme dans toute situation pathologique ou prophylactique où celle-ci est nécessaire.

25

Le véhicule pharmaceutique est choisi en fonction du mode d'administration choisi. Outre les voies systémiques, la FHA ou les équivalents fonctionnels de celles-ci tels que définis plus haut se prêtent particulièrement à une administration par voie orale ou par voie mucosale, et peuvent donc être associés aux différents véhicules ou excipients adaptés à ces voies d'administration.

L'invention porte enfin sur un médicament pour le développement des défenses immunitaires d'un organisme et comprenant la FHA ou un équivalent fonctionnel de celle-ci à titre de principe actif.

5 Les résultats décrits dans la partie expérimentale ci-après ont été obtenus par administration par voie nasale de souris avec un adjuvant ou avec un immunostimulant selon l'invention. Lorsqu'une composition immunogène comprenant sous forme non liée la FHA ou un équivalent fonctionnel de celle-ci est un antigène, les trois antigènes utilisés dans des conditions  
10 expérimentales décrites ci-après sont la Sm28 GST décrite ci-avant, et l'hémocyanine de *Megathura Crenulata* (KLH).

Les inventeurs ont ainsi mis en évidence que l'administration intra nasale de l'antigène avec la FHA présentait les propriétés suivantes :

a) dans des conditions où l'antigène seul n'est pas capable d'induire  
15 une réponse sérique significative, la présence de FHA a permis d'induire l'induction d'une réponse immune spécifique chez 7 souris sur 9. De plus, l'induction d'une réponse immune dirigée contre l'antigène n'est pas corrélée avec une réponse dirigée contre la FHA.

b) l'analyse des anticorps présents dans les liquides de lavage  
20 broncho-alvéolaires (BALF) indique de manière surprenante que la FHA entière a un effet adjuvant sur la production d'IgA non spécifiques de l'antigène au niveau broncho-alvéolaire alors qu'il n'y a pas d'effets significatifs sur la quantité totale d'IgG.

c) les résultats exposés ci-après indiquent que cette activité  
25 adjuvante de la FHA s'exprime au moins vis-à-vis de deux antigènes différents.

En outre, cette activité adjuvante persiste par voie systémique : des souris immunisées par voie sous-cutanée par l'antigène seul ou l'antigène et

l'adjuvant de l'invention deux fois à deux semaines d'intervalle répondent mieux dans le cas où l'adjuvant est présent.

- 5 d) si des souris préalablement vaccinées, par exemple par le DTCoq, sont immunisés par voie nasale deux mois plus tard avec un antigène et l'adjuvant de l'invention deux fois à deux semaines d'intervalle, il apparaît que la vaccination Dtcoq qui provoque l'apparition d'anticorps anti-FHA, n'a pas empêché l'induction d'une réponse dirigée contre l'antigène.

10 Les résultats exposés plus en détails ci-après montrent à l'évidence que l'adjuvantité de la FHA libre est une activité intrinsèque de cette molécule, qui est indépendante d'une liaison physique à l'antigène au sens défini ci-avant ; autrement dit, l'activité adjuvante de cette molécule n'est pas liée à une fonction de vectorisation de l'antigène par la FHA. En d'autres termes, la FHA peut constituer un adjuvant dans des compositions immunogènes ou dans des vaccins et ne possède aucune action de ciblage de  
15 l'antigène vers les cellules immuno-compétentes.

La FHA constitue donc un nouvel adjuvant efficace par voie mucosale représentant une alternative avantageuse aux adjuvants de l'état de la technique, qu'il s'agisse d'adjuvants sous forme particulière tels que les liposomes, les microsphères, les ISCOMs qui sont tous des structures  
20 globulaires synthétiques encapsulant l'antigène administré, ou encore aux micro-organismes recombinants exprimant un antigène d'intérêt.

En outre, la FHA se caractérise par une totale innocuité et ne provoque pas la sécrétion de cytokines proinflammatoires au niveau local, au contraire des adjuvants muqueux les plus efficaces actuellement connus que  
25 sont les toxines bactériennes, telles que la toxine cholérique, la toxine de *E. coli* et la toxine de *Bordetella pertussis*.

L'identification selon l'invention de la FHA ou d'un équivalent fonctionnel de celle-ci en tant qu'adjuvant de la réponse immunitaire, notamment de la réponse immunitaire mucosale, vient donc combler un réel

besoin dans l'état de la technique, d'un adjuvant muqueux efficace et dépourvu de toute toxicité:

De plus, l'activité adjuvante de la FHA n'est pas restreinte ou dépendante d'un haplotype donné d'antigène d'histocompatibilité. Au contraire, l'adjuvanticité de ces protéines est observée quel que soit l'haplotype de MHC, comme le démontrent les expériences réalisées sur des souris génétiquement hétérogènes, comme les souris " Outbred ", telles que les souris OF1.

Une analyse des différents isotypes d'anticorps sériques produits en réponse à l'immunisation contre ces deux antigènes en présence de FHA a montré que le rapport quantitatif entre les différents isotypes d'IgG n'était pas significativement différent selon que l'antigène était administré simultanément à la FHA.

Par ailleurs, l'analyse des isotypes d'anticorps sériques montre une prédominance d'isotypes IgG1 et IgG2a en réponse à l'administration de la Sm28GST ou de la KLH en présence de FHA.

Ces résultats indiquent que le profil isotypique des anticorps spécifiques produits dépend essentiellement de l'antigène utilisé, la FHA n'induisant pas, par elle-même, de polarisation.

L'ensemble des résultats obtenus et exposés en détail dans la partie expérimentale démontre que la FHA peut être utilisée comme adjuvant en tant que tel, quel que soit l'haplotype d'histocompatibilité de l'individu à immuniser, et quelle que soit la nature de l'antigène ou de l'immunogène à l'encontre duquel une réponse immunitaire de type mucosal et/ou systémique est recherchée.

Un tel polypeptide pourra être obtenu par recombinaison génétique conformément à l'enseignement de Brown et al. (2), de Relman et al, (3) ou encore de Delisse-Gathoye (4).

Dans un mode particulier de réalisation de la protéine FHA ou d'un équivalent fonctionnel de celle-ci selon l'invention, un polynucléotide codant la

FHA ou son équivalent fonctionnel est inséré dans un vecteur d'expression comprenant au moins un promoteur et un terminateur nécessaires à l'expression du polynucléotide dans une cellule hôte appropriée.

5 Le polynucléotide codant un équivalent fonctionnel de la FHA au sens défini ci-avant a au moins 70 % de similarité avec la séquence codant la FHA et décrite dans (2).

Par similarité, on entend le fait que, pour un même cadre de lecture, un triplet donné est traduit par le même acide aminé. Ce terme inclut donc les modifications de bases résultant de la dégénérescence du code  
10 génétique.

Le pourcentage de similarité est déterminé en comparant une séquence donnée avec la séquence de référence. Lorsque celles-ci sont de longueurs différentes, le pourcentage de similarité est basé sur le pourcentage de nucléotides de la séquence la plus courte similaires à ceux de la séquence la plus longue.  
15

Le degré de similarité peut être déterminé conventionnellement par utilisation de logiciels tels le ClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680) distribués par Julie Thompson ([Thompson@EMBL-Heidelberg.DE](mailto:Thompson@EMBL-Heidelberg.DE)) et Toby Gibson ([Gibson@EMBL-Heidelberg.DE](mailto:Gibson@EMBL-Heidelberg.DE)) du Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany. ClustalW peut aussi être chargé à partir de plusieurs sites web incluant IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P. 163, 67404 Illkirch cedex France; <ftp://ftp-igbmc.u-strabg.fr/pub/>) et EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) et tous  
20 les sites renvoyant à l'Institut de Bioinformatique, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK).  
25

Un vecteur d'expression comprenant de tels polynucléotides comprendra en outre avantageusement au moins une origine de répllication fonctionnelle dans la cellule hôte dans laquelle l'expression de la protéine FHA

ou d'une partie de la protéine FHA recombinante est recherchée, ainsi qu'au moins un marqueur de sélection tel qu'un marqueur de résistance à un antibiotique, par exemple la néomycine, la tétracycline, la rifampycine ou l'ampicilline.

5            Une cellule hôte appropriée peut être indifféremment d'origine bactérienne ou eucaryotique.

          Pour construire de tels vecteurs d'expression et transformer ou transfecter des cellules hôtes appropriées, l'homme du métier pourra se référer avantageusement à l'ouvrage de Sambrook et al. (2001), Molecular  
10            Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>ème</sup> Edi. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

          La purification de la protéine FHA recombinante ou de son équivalent fonctionnel peut être réalisée par des techniques bien connues de l'homme du métier.

15            La protéine FHA peut également être préparée par des procédés classiques de synthèse chimique, indifféremment en solution homogène ou en phase solide.

          A titre illustratif de tels procédés de synthèse chimique polypeptidique, l'homme du métier pourra se référer à l'enseignement de  
20            Houbenweyl (1974), In Methode der Organischen Chemie, E. Wunsh Ed., Vol.15-I et 15-II, Thieme, Stuttgart ou encore la technique de Merrifield (1965a;1965b); Merrifield RB, (1965a), Nature, 207(996): 522-523, Merrifield (1965b), Science, 150(693):178-185.

          La protéine FHA telle que précédemment définie peut également  
25            être utilisée pour la préparation d'une composition adjuvante d'une réponse immunitaire lorsque certains acides aminés sont substitués par substitution conservative. Par substitution conservative, on entend la substitution d'un acide aminé par un autre n'ayant aucune conséquence ou des conséquences mineures sur la structure tertiaire de la séquence et sur les caractères



d'hydrophobicité de la même séquence. A titre d'exemple, la substitution d'une guanine par une alanine ou vice-versa est qualifiée de substitution conservative. De la même façon, la valine, la leucine, l'isoleucine sont des acides aminés qui peuvent être substitués mutuellement de façon conservative. D'autres groupes de substitution conservative peuvent être, sans être limitatifs, (D,E), (K,R), (N,Q), (F,W, Y).

Dans un mode particulier de réalisation d'un polypeptide contenant tout ou partie de la protéine FHA mature, ledit polypeptide pourra avantageusement être rendu résistant à la protéolyse, par exemple par remplacement de la liaison peptidique -CONH- par une liaison réduite -CH<sub>2</sub>NH-, une liaison rétro-inverso -NHCO-, une liaison méthylène-oxy -CH<sub>2</sub>O-, une liaison thiométhylène -SH<sub>2</sub>-S-, une liaison carba -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, une liaison cétométhylène -CO-CH<sub>2</sub>-, une liaison hydroxyéthylène -CHOH-CH<sub>2</sub>-, une liaison -N-N, une liaison E-alcène ou encore une liaison -CH=CH-.

Selon un autre mode de réalisation, le polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence d'acides aminés de la protéine FHA, un ou plusieurs résidus d'acides aminés de la forme L pourront être remplacés par l'acide aminé correspondant sous la forme D; un résidu acide glutamique pourra être remplacé par un résidu d'acide pyro-glutamique. La synthèse de peptides contenant au moins un résidu d'acides aminés sous la forme D est par exemple décrite par Koch Y., (14).

Selon un autre aspect, la composition immunogène selon l'invention est caractérisée en ce que l'antigène d'intérêt est d'origine bactérienne, virale ou parasitaire, animale, végétale ou humaine.

La présente invention est en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures et les exemples suivants :

La figure 1 illustre les titres d'anticorps sériques spécifiques de la protéine Sm28GST ou de la FHA, après immunisation de souris contre la protéine Sm28GST en présence ou en l'absence de FHA.

La figure 2 représente les densités optiques observées pour une dilution de  $\frac{1}{4}$  en anticorps isotypes IgA et IgG dans les fluides de lavage bronchoalvéolaire de souris immunisées contre la Sm28GST en présence ou en absence de FHA.

5 La figure 3 représente les densités optiques observées pour une dilution de  $\frac{1}{80}$  en anticorps totaux d'isotypes IgA et IgG dans les fluides de lavage bronchoalvéolaires de souris immunisées avec la protéine Sm28GST en présence ou en absence de FHA.

10 La figure 4 illustre le profil isotypique des anticorps sériques spécifiques de la Sm28GST chez des souris immunisées contre cette protéine en présence ou en absence de FHA.

La figure 5 illustre une élution sélective de la FHA et de la protéine Sm28GST à partir d'un mélange de l'adjuvant et de cet antigène.

15 La figure 6 illustre la réponse spécifique anti Sm28GST après vaccination avec le Dtcoq.

La figure 7 illustre les titres en anticorps obtenus après administration par voie sous-cutanée de l'antigène Sm28GST avec ou sans la FHA après immunisation deux fois à deux semaines d'intervalle. L'analyse de la réponse sérique a été observée une semaine plus tard.

20 La figure 8 représente l'effet adjuvant et immuno-stimulant de la FHA, après administration par voie orale à trois groupes de souris ayant reçu à deux semaines d'intervalle :

- 30  $\mu$ g de KLH,
- 30  $\mu$ g de KLH + 5  $\mu$ g de FHA entière.

25 La figure 8a représente la densité optique à J21 observées en IgG1, IgG2a et IgG2b spécifiques de la KLH dans les sérums pour les dilutions respectives de  $\frac{1}{800}$ ,  $\frac{1}{100}$  et  $\frac{1}{100}$ .

La figure 8b représente la densité optique à J21 observées en IgG totaux non spécifiques dans les sérums pour une dilution de  $\frac{1}{10000}$ .

La figure 8c représente la densité optique à J21 observées en IgA, totaux non spécifiques dans les liquides de lavages intestinaux pour une dilution de 1/800.

5 La figure 9 représente l'analyse des mRNA induits localement au niveau du poumon après administration soit de solution saline apyrogène, soit de 5 µg de FHA, soit de 20 µg de LPS.

### **EXEMPLES:**

#### **A. MATERIELS ET METHODES**

10

##### **• Antigènes**

La glutathion S-transférase de *Schistosoma mansoni* (Sm28GST) a été fournie par la Société Transgène (Strasbourg, France). La FHA a été purifiée par chromatographie sur une colonne d'héparine-Sépharose, comme décrit précédemment (Menozzi et al. FEMS, 1991) à partir des surnageants de *B. pertussis* BPRA [*Bordetella pertussis* RA], une souche dépourvue du gène de la toxine pertussique.

15

La préparation de FHA a été éluée sur une colonne d'Acticlean [Stérogène] pour éliminer les contaminants endotoxiniques. L'activité endotoxinique finale a ensuite été évaluée par un test Limulus (Biowhittaker). L'hémocyanine de *Megathura crenulata* (KLH) a été achetée chez Calbiochem.

20

##### **• Immunisations**

25

Des souris OF1 de 6 semaines (Iffa Credo, L'Arbresle, France) ont été anesthésiées par voie intrapéritonéale avec 200 µl de pentobarbital sodique (5%; Sanofi, Libourne, France) pour 10 g de poids corporel. Les souris ont été immunisées par voie nasale avec 40 µl de solution saline apyrogène dans laquelle ont été diluées les différentes préparations

antigéniques. Les souris ont été instillées deux fois à deux semaines d'intervalle et sacrifiées une semaine plus tard pour pouvoir effectuer les prélèvements sanguins et les lavages broncho-alvéolaires. Les doses d'antigène utilisées sont décrites dans les exemples.

5

• Recueil et analyse des échantillons

Les souris ont été saignées à la queue (ou par ponction cardiaque le jour du sacrifice) et les sérums ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour de l'analyse. Les liquides de lavages bronchoalvéolaires (BALF) ont été collectés par cannulation de la trachée et résultent d'un lavage des poumons avec 0,5 ml de PBS. Après centrifugation de 10 mn à 4000g pour éliminer les cellules et les débris tissulaires, les BALF ont ensuite été congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  après adjonction de fluorure de phényl-méthyl-sulfonyle à la concentration finale de 1 mM.

10

Les taux d'anticorps dans le sérum et dans les BALF ont été déterminés par ELISA. Les microplaques (Maxisorp, Nunc) ont été incubées pendant toute la nuit à  $4^{\circ}\text{C}$  avec 50  $\mu\text{l}$ /puits d'une solution de FHA (5 $\mu\text{g/ml}$ ) ou de Sm28GST (10  $\mu\text{g/ml}$ ), ou de KLH (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Les sérums dilués dans du PBS contenant 1‰ de Tween-20 et 5‰ de gélatine (PBS/Tw/g), ont alors été ajoutés dans les plaques après 4 rinçages avec du PBS contenant 1‰ de Tween-20 (PBS/Tw). Après incubation pendant une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ , les plaques ont été rincées 4 fois avec du PBS/Tw puis incubées avec différentes dilutions d'anticorps (dans du PBS/Tw/g; 1h30 à  $37^{\circ}\text{C}$ ) conjugués à la peroxydase (anti-souris IgG (H+L) ou IgG1, ou IgG2a, ou IgG2b ou IgG3; Southern Biotechnologies Associates, Birmingham, USA). Après 4 rinçages avec du PBS/Tw, les plaques ont été révélées avec une solution à 1 mg/ml d'ABTS (Sigma) dans du tampon citrate (0,1 M pH 4) et contenant 0,03% d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . La densité optique a été mesurée à 405 nm (Titertek Multiscan MCC/340) au bout

15

20

25

de 30 minutes. Les anticorps d'isotype IgA ont été détectés après incubation avec un anticorps anti-IgA de souris biotinylé (Zymed) dilué dans du PBS/Tw/g pendant 1h30 à 37°C. Après 4 rinçages avec du PBS/Tw, les plaques ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C en présence de streptavidine couplée à la peroxydase (Amersham) diluée dans du PBS/Tw/g. Après 6 rinçages avec du PBS/Tw, les plaques ont été révélées avec une solution d'OPD (1mg/ml; Sigma) pendant 30 minutes à 37°C. La réaction a été stoppée avec une solution d'HCl 2N et la densité optique a été mesurée à 492 nm. La droite de régression donnant le logarithme de la densité optique observée en fonction de l'inverse de la dilution a été calculée. Les titres correspondent, par extrapolation de cette droite, à l'inverse de la dilution pour laquelle la valeur de la densité optique est égale à trois fois la valeur de la densité optique obtenue avec du PBS.

La détection des anticorps dans les BALF s'effectue de la même façon avec quelques modifications. Après l'adsorption de l'antigène, les plaques sont saturées avec une solution de gélatine (5‰ en PBS) pendant 30 minutes à température ambiante. Les BALF et les anticorps sont ensuite dilués avec du PBS/Tw. Les concentrations d'IgA totales et d'IgG totales dans ces BALF ont été évaluées sur des microplaques dans lesquelles ont été préalablement adsorbés des anticorps anti-souris IgA ou IgG non marqués et comparaison avec une gamme étalon réalisée avec de l'IgA ou de l'IgG myélomateux de souris purifié (Sigma).

**• Test de Liaison**

Des billes de Sépharose couplées à l'héparine (CL-6B; Pharmacia) ont été resuspendues dans du PBS et tassées dans une colonne (diamètre 1 cm pour 1,3 ml de gel). Après rinçage de cette colonne, une solution  
5 contenant de la Sm28GST (200 µg) et de la FHA (40 µg) a été déposée.

Après rinçage, des concentrations croissantes de NaCl ont été déposées sur cette colonne (de 0,1 M NaCl jusqu'à 1M). L'analyse des échantillons recueillis après passage sur la colonne puis élution, a été effectuée, après précipitation au TCA, par électrophorèse sur gel d'acrylamide.

**10 • Détermination des ARN messagers**

Les souris sont immunisées comme précédemment, par voie nasale (volume = 50 µl) soit avec du sérum physiologique apyrogène, soit avec 5 µg de FHA, soit avec 20 µg de LPS (Sigma). Des souris non administrées sont utilisées comme témoin. A différentes périodes de temps (entre 1 h et 48 h) les  
15 souris sont sacrifiées, les poumons entiers sont prélevés et broyés dans une solution de RNazol®. Les ARN sont extraits à l'aide de chloroforme puis précipités par l'isopropanol. Après lavage, le culot d'ARN est remis en suspension dans l'eau. Une transcription reverse est réalisée et permet de synthétiser l'ADNc correspondant aux ARN extraits. Sur tous nos extraits des  
20 expériences de polymérisation en chaîne (PCR) ont été réalisées et ont permis l'amplification de fragments d'ADN spécifique de différents marqueurs avec les couples d'amorces indiqués dans le tableau ci-dessous :



| CYTOKINE     | SEQUENCES                                                                                         |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IL1 Ra       | sens 5' AGA CCC TGC AAG ATG CAA GCC TTC AGG 3'<br>anti-sens 5' GGT CAG CCT CTA GTG TTG TGC AGA 3' |
| IL6          | sens 5' GTG ACA ACC ACG GCC TTC CCT ACT 3'<br>anti-sens 5' GGT AGC TAT GGT ACT CCA 3'             |
| IL10         | sens 5' CGG GAA GAC AAT AAC TG 3'<br>anti-sens 5' CAT TTC CGA TAA GGC TTG G                       |
| IL12         | sens 5' GAC CCT GCC CAT TGA ACT GGC 3'<br>anti-sens CAA CGT TGC ATC CTA GGA TCG 3'                |
| TNF $\alpha$ | sens 5' AGC CCA CGT CGT AGC AAA CCA CCA A 3'<br>anti-sens 5' ACA CCCATT CCC TTC ACA GAG CAA T 3'  |
| MHC II       | sens 5' TGT CCA GGA CAG AGG CCC TC 3'<br>anti-sens 5' TCC ACA TGG CAG GTG TAG AC 3'               |
| B7-1         | sens 5' GTA TTG CTG CCT TGC CGT TA 3'<br>anti-sens 5' ATG GTG TGG TTG CGA GTC GT 3'               |
| B7-2         | sens 5' AGG ACA TGG GCT CGT ATG AT 3'<br>anti-sens 5' GAA CAC ACA CAA CGG TCA TA 3'               |

Les produits d'amplification ont été visualisés par utilisation de bromure d'éthidium après migration sur un gel d'agarose. Les bandes obtenues ont été analysées par une technique d'analyse d'image et un index correspondant à l'intensité de ces bandes a été établi.

#### EXEMPLE 1

Etude de l'activité adjuvante de la FHA vis-à-vis d'une réponse immunitaire à l'encontre de la protéine Sm28GST de *Schistosoma mansoni*.

Des souris OF1 (" Outbred ") ont reçu une administration par instillation nasale avec 50µg de Sm28GST, en présence ou non de 5 µg de FHA dilués dans le même échantillon, deux fois à deux semaines d'intervalle.

La production d'anticorps sériques d'isotype IgG sérique spécifiques de la Sm28GST ou de la FHA une semaine après la deuxième instillation nasale a été analysée et les résultats sont reportés dans la figure 1.

Le titre en anticorps IgG sériques dirigés contre la Sm28 (barres grisées) et la protéine FHA (barres noires) a été mesuré dans le sérum de souris ayant reçu respectivement la protéine Sm28GST (figure 1A), un mélange Sm28GST + FHA (figure 1B).

Ces résultats indiquent que la protéine Sm28GST seule n'est pas capable d'induire une réponse en anticorps sérique significative. En revanche, la présence de FHA a permis l'induction d'une réponse immunitaire spécifique contre la Sm28GST chez sept souris sur neuf. En outre, l'analyse de la réponse dirigée contre la FHA chez ces animaux montre que l'induction d'une réponse immune dirigée contre la Sm28GST n'est pas nécessairement corrélée avec une réponse spécifique dirigée contre la FHA.

## **EXEMPLE 2 :**

### **Etude de l'activité adjuvante de la FHA sur la Production d'anticorps par les cellules immunitaires du tractus respiratoire.**

Des souris OF1 ont été immunisées selon le protocole décrit à l'exemple 1 et la production d'anticorps d'isotypes IgG et IgA totaux ou spécifiques de la protéine Sm28GST contenus dans les liquides de lavage bronchoalvéolaires ont été analysés. Les résultats sont reportés dans les figures 2 et 3.

Les titres en anticorps spécifiques de la protéine Sm28GST (figure 2) ou en anticorps totaux (figure 3) dans les liquides de lavage

bronchoalvéolaires d'isotype IgA (A, B) ou IgG (C, D) ont été mesurés chez des souris, 21 jours après la seconde instillation nasale de Sm28GST (B, D), de Sm28GST + FHA (A, C).

5 Les résultats de la figure 2 indiquent que la présence de la FHA lors de l'immunisation n'a pas induit une production détectable d'anticorps spécifiques de la Sm28GST dans les liquides de lavage bronchoalvéolaires.

10 Les résultats de la figure 3 montrent que l'on peut observer un effet notable de la FHA sur la quantité d'anticorps totaux d'isotype IgA contenus dans les liquides de lavage bronchoalvéolaires, alors qu'il ne semble pas y avoir d'effet significatif sur la quantité totale d'anticorps d'isotype IgG.

### EXEMPLE 3 :

#### Etude de la polarisation de l'activité adjuvante de la FHA : réponse isotypique.

15 Les protocoles d'immunisation sont identiques à ceux des exemples 1 et 2, des instillations nasales ayant été réalisées chez les souris avec un mélange contenant respectivement 50 µg d'antigène et 5 µg de FHA.

20 Les titres en anticorps sériques spécifiques d'un antigène ou immunogène d'intérêt ont été mesurés 21 jours après la seconde instillation nasale de souris ayant reçu respectivement cet antigène ou cet immunogène. La qualité des différents isotypes IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 a été mesurée (figure 4).

L'antigène utilisé est la protéine Sm28GST de *Schistosoma mansoni*.

25 Les résultats de la figure 4 montrent, comme cela a déjà été montré dans les exemples 1 et 2, l'activité adjuvante de la FHA entière. L'analyse du profil des différents isotypes d'anticorps IgG montre une production

quantitativement similaire d'anticorps d'isotypes IgG1 et IgG2a, spécifiques de la protéine Sm28GST, significative d'une réponse immunitaire dite " mixte ".

**EXEMPLE 4 :**

5           **La FHA et l'antigène ne sont pas physiquement liés dans une composition immunogène selon l'invention.**

10           Afin de déterminer l'existence d'une liaison physique non covalente entre l'antigène d'intérêt de la FHA, de nature à constituer un complexe, un mélange de FHA et de Sm28GST a été préparé comme indiqué dans la partie " Matériels et Méthodes ".

          Le mélange FHA et Sm28GST a été déposé sur une colonne d'héparine. Une élution a été réalisée avec des concentrations croissantes de NaCl, chacune des fractions d'élution ayant ensuite été analysée pour sa concentration en protéines (figure 5b).

15           Des fractions ont également été soumises à une migration électrophorétique dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS simultanément à une série de marqueurs de poids moléculaire protéique (figure 5a).

20           Les résultats montrent que l'élution dans un gradient croissant de NaCl a permis de désorber la FHA dès une concentration de 0,5 M de NaCl (voir figure 5b). Par ailleurs, l'analyse de la nature des protéines présentes dans les différentes fractions d'élution a permis de montrer qu'aucune trace de la protéine Sm28GST n'était détectée (figure 5a).

25           En conséquence, il est ici montré une absence totale d'interaction physique covalente ou non covalente entre la FHA et l'antigène d'intérêt.

**EXEMPLE 5 :****L'activité adjuvante de la FHA persiste chez les sujets vaccinés.**

Des souris OF1 ont été vaccinées par injection sous-cutanée de 50 µl de gène Dtcoq (vaccin commercial). Deux mois plus tard elles ont été immunisées par voie nasale, deux fois à deux semaines d'intervalle. L'analyse de la réponse sérique obtenue une semaine plus tard, montre que la vaccination par le Dtcoq, qui provoque l'apparition d'anticorps circulant anti-FHA n'a pas empêché l'induction d'une réponse dirigée contre la Sm28GST dans le groupe co-administré avec de la FHA (fig. 6).

Les expériences des exemples 5 et 6 confirment le pouvoir adjuvant intrinsèque de la FHA, par une voie systémique et son utilisation potentielle dans les populations vaccinées.

**EXEMPLE 6 :****L'activité adjuvante de la FHA persiste par voie systémique.**

Des souris OF1 ont été immunisées par voie sous-cutanée soit avec 50 µg de SmGST, deux fois à deux semaines d'intervalle. L'analyse de la réponse sérique obtenue une semaine plus tard, montre l'induction d'une réponse dirigée contre la Sm28GST dans les deux groupes qui ont été co-administrés avec de la FHA (fig. 7). Cette réponse reste cependant plus faible que celle qui avait été obtenue par voie nasale.

**EXEMPLE 7 :****L'activité adjuvante de la FHA et de la FHA44 parasite persiste par voie orale.**

Des souris OF1 ont été immunisées par voie orale soit avec 30 µg de KLH, soit avec 30 µg de KLH et 5 µg de FHA, deux fois à deux semaines d'intervalle. L'analyse de la réponse sérique obtenue une semaine plus tard,

montre l'induction d'une réponse dirigée contre la KLH dans le groupe co-administré avec de la FHA (Figure 8A).

Pour l'administration par voie orale, la ou les protéines sont mises en solution à la concentration requise dans une solution de PBS contenant 30 g/l de  $\text{NaHCO}_3$ . L'administration d'un volume de 200  $\mu\text{l}$  se fait sur les animaux non anesthésiés à l'aide d'une sonde gastrique.

Les lavages intestinaux sont effectués à J21 après rupture cervicale des animaux selon une modification de la technique décrite par Nedrud et coll. (1987). L'intestin est sectionné sous l'estomac et au-dessus du caecum et rincé dans le PBS. Puis il a été fendu sur toute la longueur. L'intestin et son contenu ont été re-suspendus dans 2 ml du tampon suivant 25 mM NaCl, 40mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 10mM KCL, 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 50mM EDTA, 162 mg/ml de polyethylene glycol (M.W. 3350) et 1 % d'aprotinine. Après centrifugation les surnageants sont congelés après addition de 1 mM PMSF.

A part ce point particulier, les conditions de matériel et méthodes en particulier pour les dosages d'anticorps, sont identiques à celles précédemment citées.

#### **EXEMPLE 8 :**

**La FHA peut provoquer une activation polyclonale des plasmocytes ce qui génère une production d'anticorps.**

##### **8.1. Administration par voie nasale :**

La figure 3 de l'exemple 2 illustre les taux d'anticorps totaux non spécifiques détectés dans les liquides de lavage broncho-alvéolaires après administration par voie nasale de Sm28GST en présence ou non de FHA ou de FHA44.

Comme il était précisé plus haut, les résultats de la figure 3 montrent que la FHA44 induit des taux massifs d'anticorps d'isotypes IgA et



IgG totaux dans les sécrétions bronchoalvéolaires qui ne peuvent être uniquement corrélés à l'apparition des anticorps spécifiques.

#### 8.2 Administration par voie orale :

5 L'analyse des taux d'immunoglobulines totaux des prélèvements obtenus lors de l'expérience d'administration par voie orale a été effectuée. On observe une nette augmentation des IgG totaux sériques dans le groupe qui a reçu de la FHA (Figure 8 B). De plus, la FHA a été capable d'augmenter les taux d'IgA non spécifiques dans les liquides de lavage intestinal (Figure 8 C) alors même qu'aucune réponse spécifique n'y a été détectable.

10 Cette activité non spécifique de la FHA et de ses dérivés indique que ces produits bactériens sont capables de stimuler l'immunité générale de l'organisme.

15 Il apparaît que si la FHA se révèle comme particulièrement performante comme adjuvant pour une réponse spécifique (figure 8a), la FHA apparaît comme un meilleur immunostimulant des IgG non spécifiques.

#### EXEMPLE 9 :

La FHA induit localement une augmentation d'ARNm codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité MHCII et pour la molécule de costimulation B7-1.

20 Des souris OF1 ont été administrées par voie nasale avec 5 µg de FHA ou 20 µg de LPS ou seulement de l'eau physiologique apyrogène. Après différentes périodes de temps (1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h) les souris ont été sacrifiées et les poumons prélevés. L'analyse par RT-PCR des ARNm de ces extraits a permis d'observer une augmentation des ARNm codant pour  
25 le complexe majeur d'histocompatibilité MHCII et pour la molécule de costimulation B7-1 dans le groupe FHA par rapport au groupe eau physiologique. En revanche le niveau d'expression des mRNA des différentes cytokines étudiées n'a présenté aucune différence entre ces deux groupes alors qu'une forte augmentation était observée dans le groupe LPS témoin.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 9.

5 L'augmentation de MHCII et de B7-1 suggère une augmentation de la présentation au niveau local induite par la FHA qui pourrait en partie expliquer son activité adjuvante. De plus, on peut noter que l'absence d'une surexpression des cytokines pro-inflammatoires induite par la FHA est une qualité supplémentaire de cette molécule en vue de son utilisation comme adjuvant.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) • LOCHT, C., BERTIN P., MENOZZI F.D., and RENAUD G. (1993).  
The filamentous haemagglutinin, a multifaced adhesin produced by virulent  
5 *Bordetella* sp. Mol. Microbiol. 9: 653-660.
- (2) • BROWN, D.R., and PARKER, C.D. (1987). Cloning of the  
filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* and its expression in  
Escherichia coli. Infect. Immun., 55:154-161.
- (3) • RELMAN D., DOMENIGHINI, M., TUOMANEN, E., RAPPUOLI, R.  
10 and FALKOW, S. (1989). Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*:  
nucleotide sequence and crucial role in adherence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,  
86:2637-2641.
- (4) • DELISSE-GATHOYE, A. M., LOCHT, C., JACOB, F.,  
RAASCHOU-NIELSEN, M., HERON, I., RUELLE, J.L., DE WILDE, M., and  
15 CABEZON, T. (1990). Cloning, partial sequence, expression and antigenic  
analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. Infect.  
Immun. 58:2895-2905.
- (5) • MAKHOV, A.M., HANNAH, J.H., BRENNAN, M.J., TRUS, B.L.,  
KOCSIS, E., CONWAY, J.F., WINGFIELD, P.T., SIMON, M.N., and STEVEN,  
20 A.C. (1994). Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: a bacterial  
adhesin formed as a 50nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat  
motif rich in  $\beta$ -strands and turns. J. Mol. Biol., 241:110-124.
- (6) • RENAULD-MONGENIE, G., CORNETTE, J., MIELCAREK, N.,  
MENOZZI, F.D., and . LOCHT, C. (1996). Distinct roles of the N-terminal and  
25 C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis*  
filamentous hemagglutinin. J. Bacteriol. 178:1053-1060.
- (7) • GREGORIADIS, G. (1990). Immunological adjuvants: a role for  
liposomes. Immunol. Today 11: 89-97.

- (8) • ELDRIDGE, J. H., GILLEY, R. M., STAAS, J. K., MOLDOVEANU, Z., MEULBROEK, J. A., and TICE, T. R. (1989). Biodegradable microspheres: vaccine delivery system for oral immunization. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 146: 59-66.
- 5 (9) • MOWAT, A. M. and DONACHIE, A. M. (1991). ISCOMs-a novel strategy for mucosal immunization? *Immunol. Tod.* 12: 383-385.
- (10) • RENAULD-MONGENIE, G., MIELCAREK, N., CORNETTE, J., SCHACHT, A.M., CAPRON, A., RIVEAU, G., and LOCHT, C. (1996). Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7944-7949.
- 10 (11) • MIELCAREK, N., RIVEAU, G., REMOUE, F., ANTOINE, R., CAPRON, A., and LOCHT, C. (1998). Homologous and heterologous protection after single intranasal administration of live attenuated recombinant *Bordetella pertussis*. *Nature Biotech.* 16: 454-457.
- 15 (12) • POULAIN-GODEFROY, O., MIELCAREK, N., IVANOFF, N., REMOUE, F., SCHACHT, A.M., PHILLIPS, N., LOCHT, C., CAPRON, A. and RIVEAU, G. (1998). Enhancement of immunogenicity by intranasal antigen delivery using liposomes bearing the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Infect. Immun.* 66: 1764-1767.
- 20 (13) • HANNA, J. H., MENNOZI, F.D., RENAULD, G., LOCHT, C., and BRENNAN, M.J. (1994). Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect. Immun.* 62: 5010-5019.
- 25 (14) • KOCH Y., BARAM, T., HAZUM, E., and FRIDKIN, M. (1977). Resistance to enzymic degradation of LH-RH analogues possessing increased biological activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74:488-491.

### REVENDICATIONS

5 1. Utilisation de la protéine FHA ou d'un équivalent fonctionnel de celle-ci, sous forme libre, pour la préparation d'une composition adjuvante de la réponse immunitaire.

2. Utilisation de la protéine FHA ou d'un équivalent fonctionnel de celle-ci dans la préparation d'une composition immunostimulante.

3. Utilisation d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 2 obtenue par substitution conservative des acides aminés.

10 4. Utilisation d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 2 rendue résistante à la protéolyse par remplacement de la liaison peptidique -CONH- par une liaison réduite -CH<sub>2</sub>NH-, une liaison rétro-inverso -NHCO-, une liaison méthylène-oxy -CH<sub>2</sub>O-, une liaison thiométhylène -SH<sub>2</sub>-S-, une liaison carba -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, une liaison cétométhylène -CO-CH<sub>2</sub>-, une liaison 15 hydroxyéthylène -CHOH-CH<sub>2</sub>-, une liaison -N-N, une liaison E-alcène ou encore une liaison -CH=CH-.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes pour laquelle l'adjuvant est une séquence d'acides aminés ayant au moins 70 % d'homologie avec la FHA.

20 6. Composition adjuvante de la réponse immunitaire comprenant sous forme libre la protéine FHA, ou une séquence dérivée selon l'une des revendications 3 à 5.

25 7. Composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend un adjuvant selon la revendication 6, en association avec une molécule immunogène ou avec un antigène.

8. Composition immunogène selon la revendication 7 caractérisée en ce que le rapport en poids de l'adjuvant et de l'immunogène est compris entre  $10^{-4}$  et  $10^4$ , de préférence entre 0,03 et 300 et de manière préférée entre 0,4 et 5.

9. Composition immunogène selon la revendication 7 caractérisée en ce que l'antigène est d'origine bactérienne, virale ou parasitaire.

10. Composition immunogène selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'antigène est choisi parmi des antigènes de *Bordetella*, de *Shigella*,  
5 de *Neisseria*, de *Borrelia*, des toxines ou toxoïdes diphtériques, tétaniques ou cholériques.

11. Composition immunogène selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'antigène est un antigène viral.

10 12. Composition immunogène selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'antigène est un antigène parasitaire, notamment de *Plasmodium*, des *Schistosoma* ou de *Toxoplasma*.

13. Vaccin comprenant une composition immunogène selon l'une des revendications 7 à 12, en association avec un véhicule pharmaceutiquement compatible.

15 14. Vaccin selon la revendication 13, caractérisée en ce que le véhicule est compatible avec une administration par voie nasale.

15. Vaccin selon la revendication 13, caractérisée en ce que le véhicule est compatible avec une administration par voie orale, par voie sous-cutanée ou par voie intraveineuse, intradermique, intramusculaire.

20 16. Vaccin selon la revendication 13, caractérisée en ce que le véhicule est compatible avec une administration par voie rectale, vaginale, oculaire ou auriculaire.

25 17. Composition immunostimulante contenant la FHA ou un équivalent fonctionnel de celle-ci comme principe actif et un véhicule pharmaceutique compatible avec une administration à l'homme ou à l'animal.

18. Composition selon la revendication 17 pour l'administration par voie orale.

19. Composition selon la revendication 17 pour l'administration par voie mucosale.



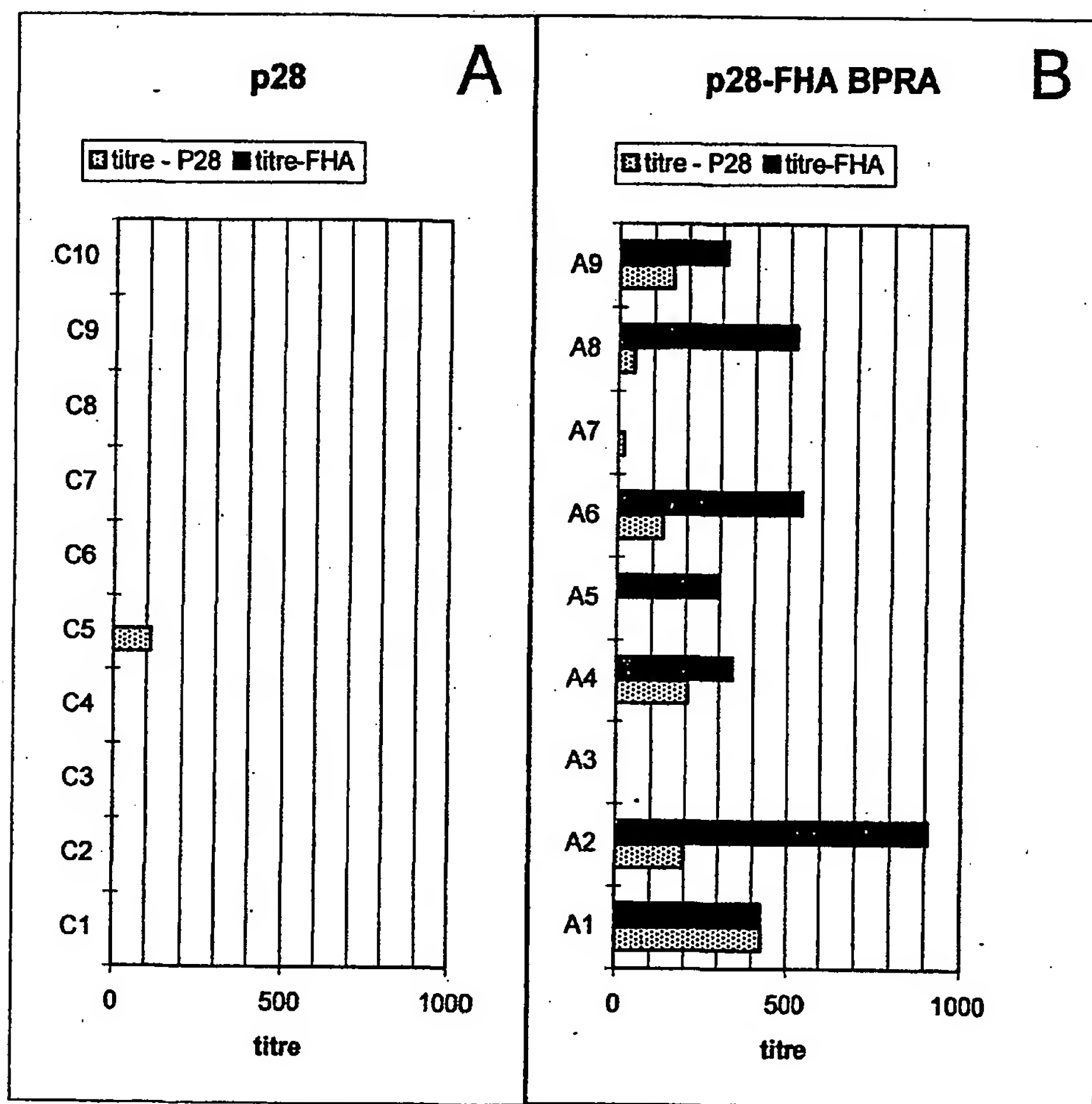


Fig. 1

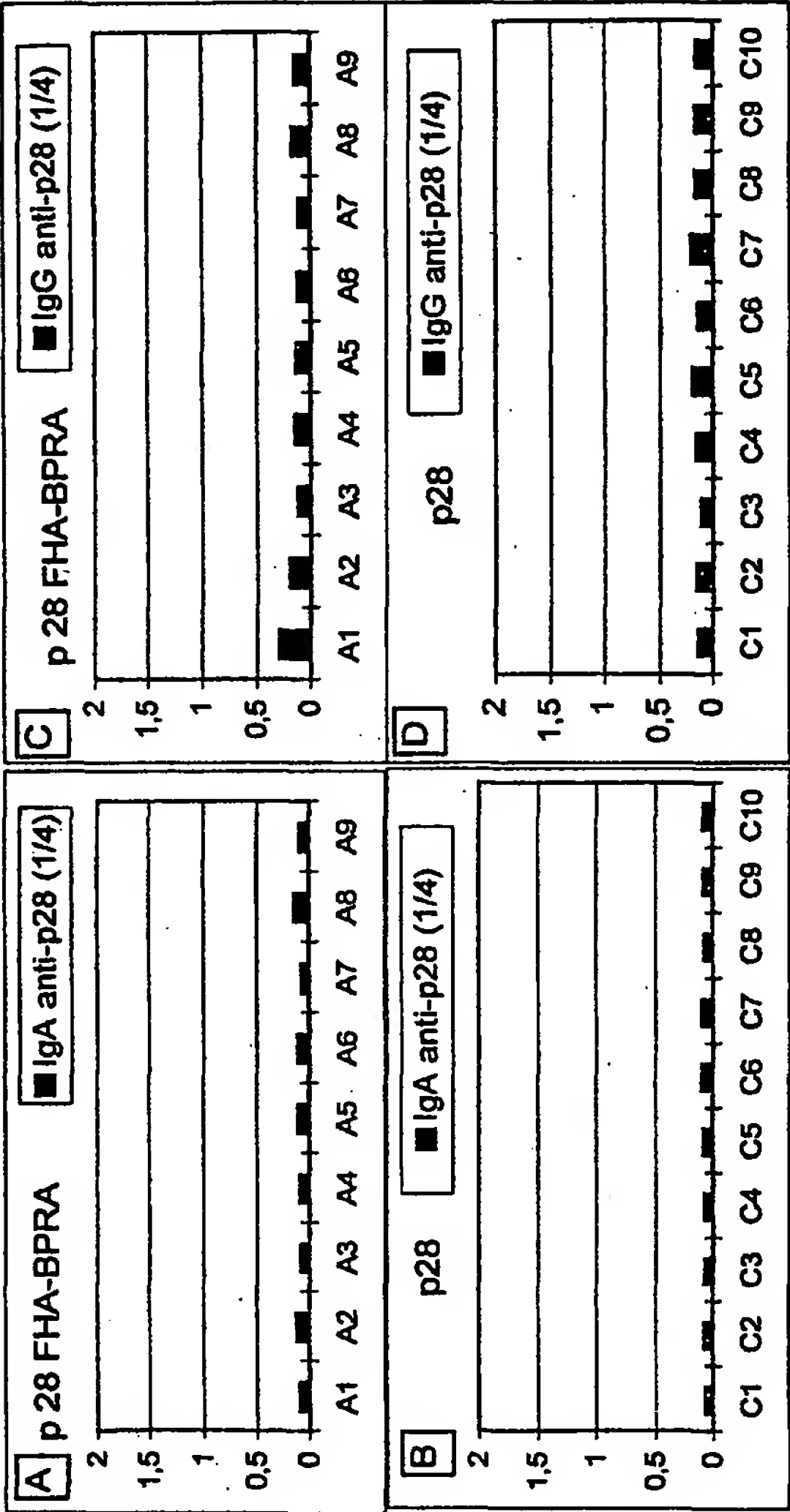


Fig. 2

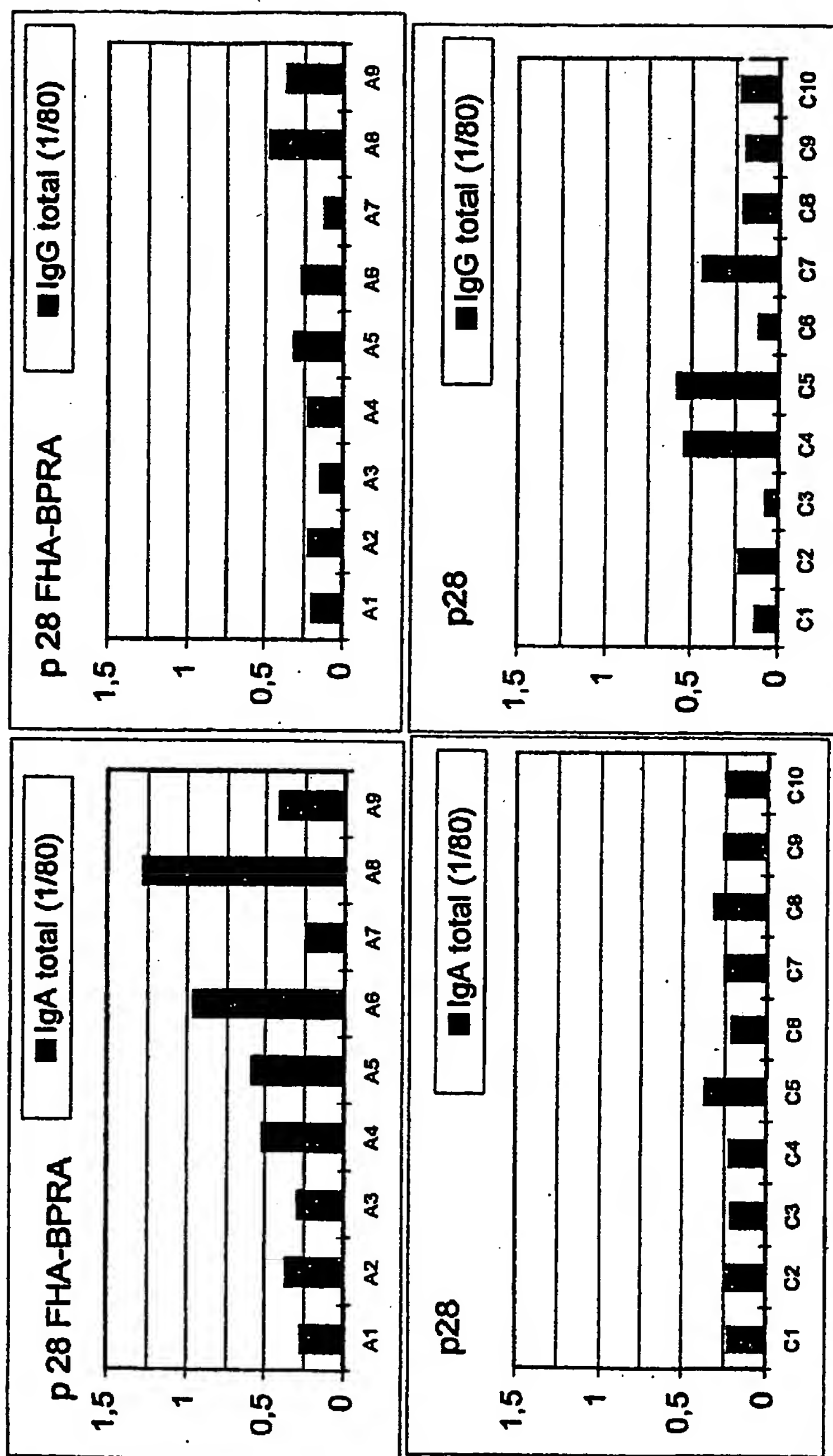
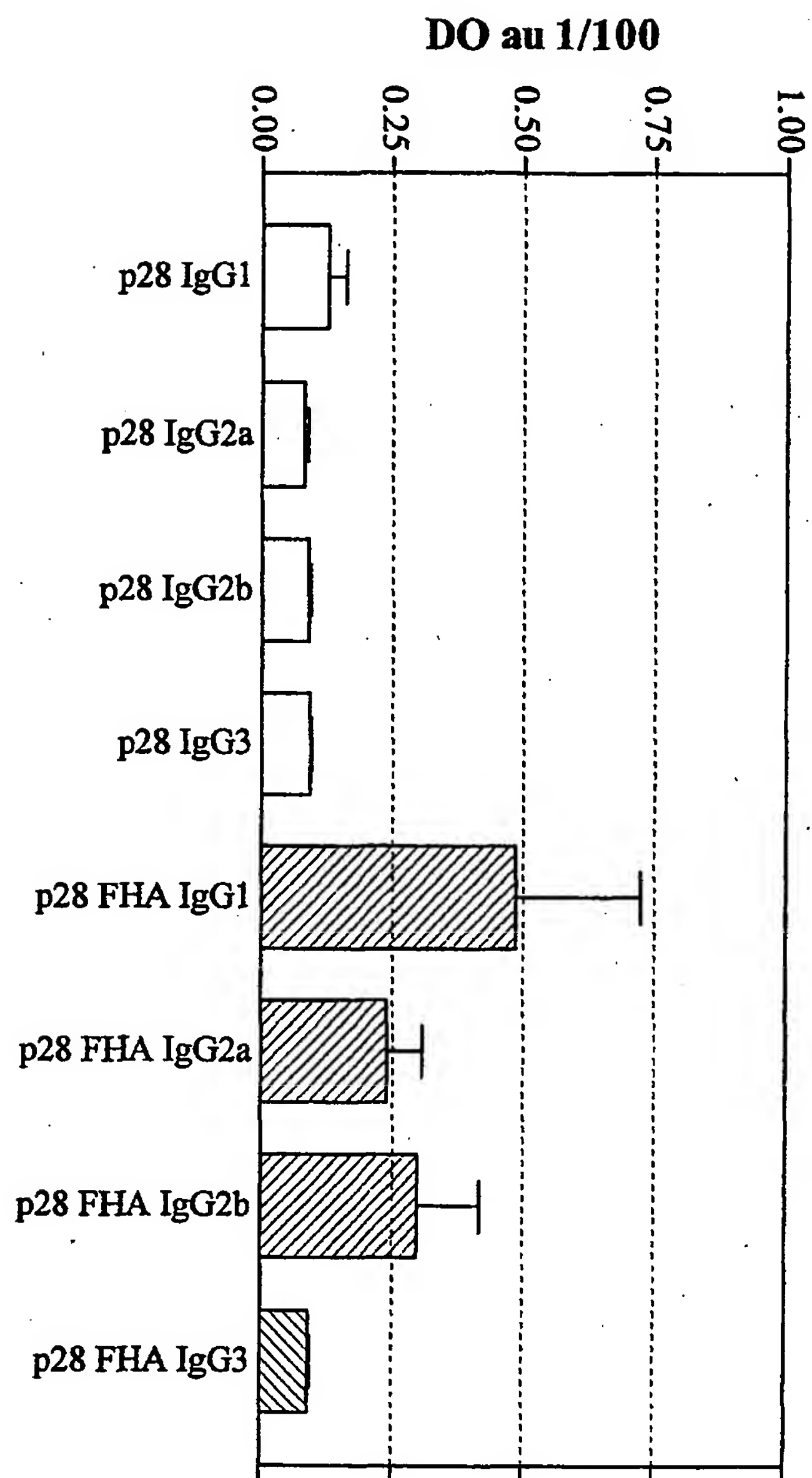
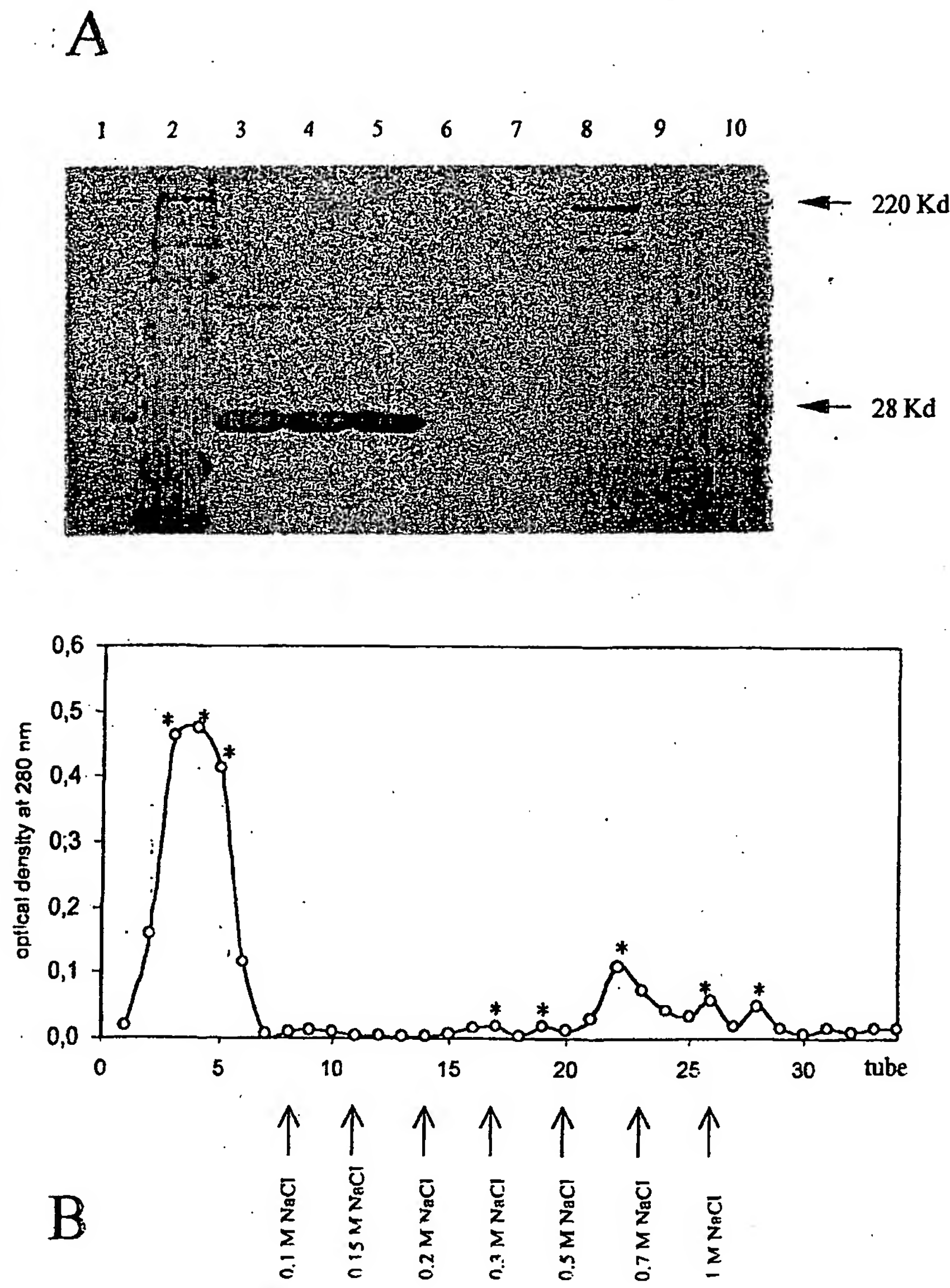
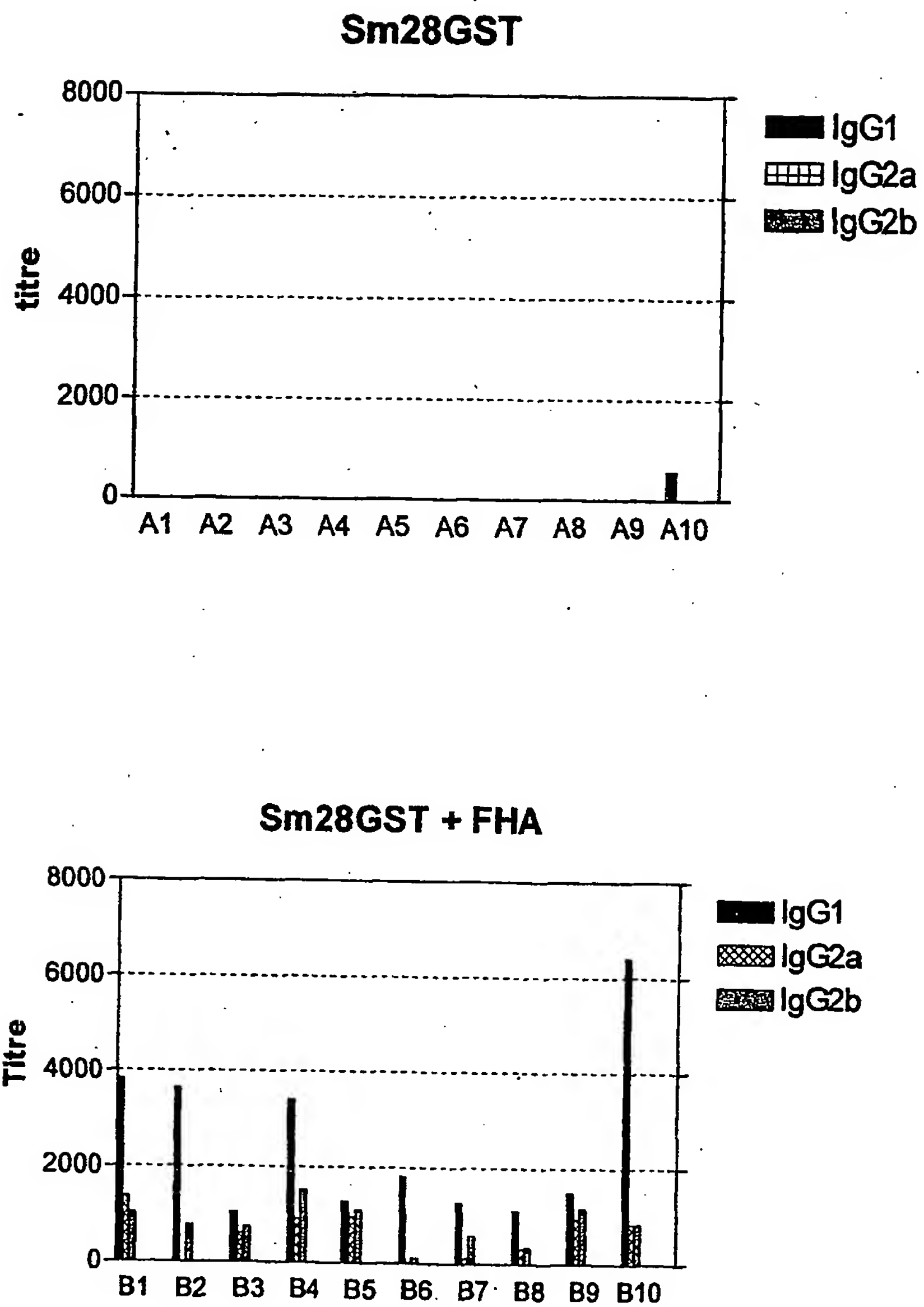


Fig. 3

**Fig. 4**



**Fig. 5**

**Fig. 6**



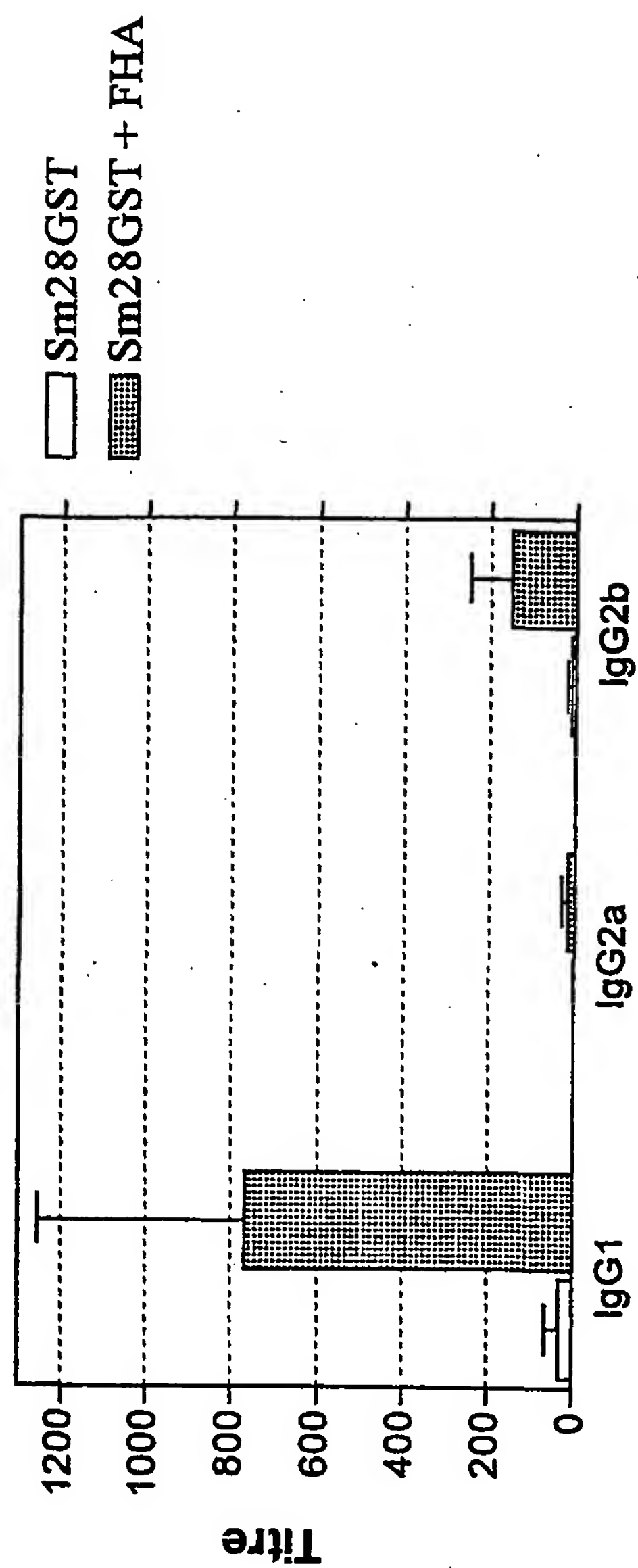
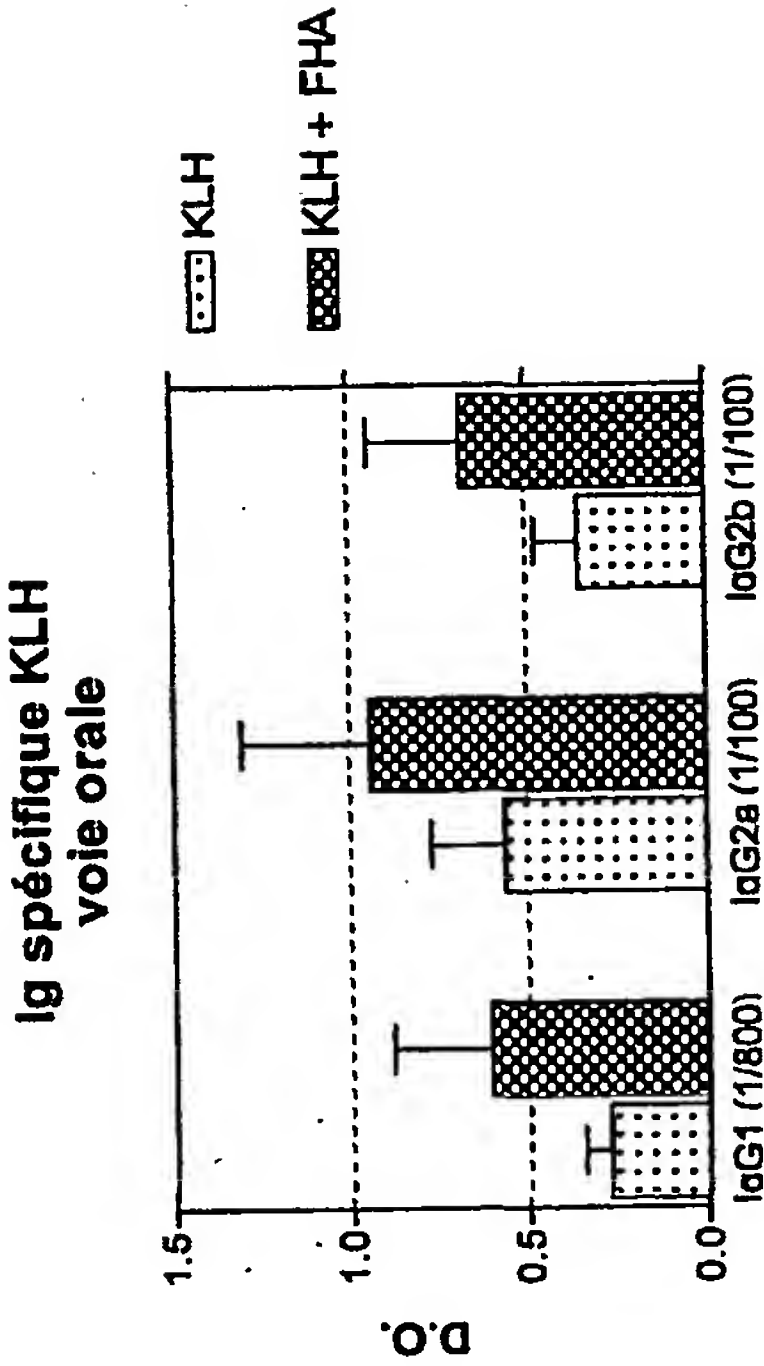
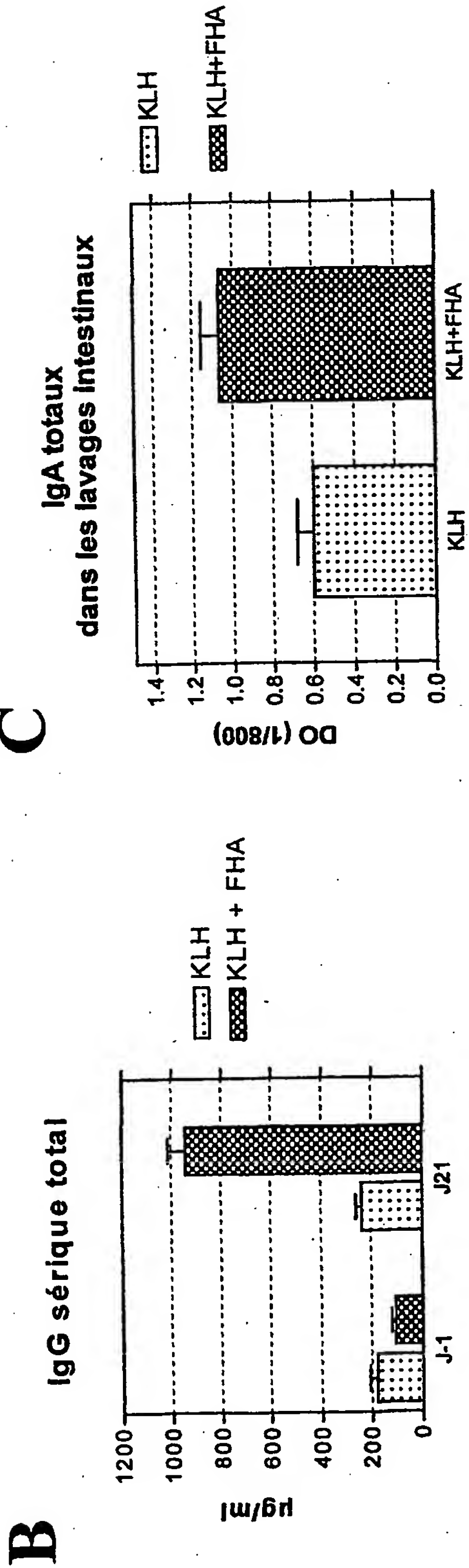


Fig. 7



**C**



**Fig. 8**

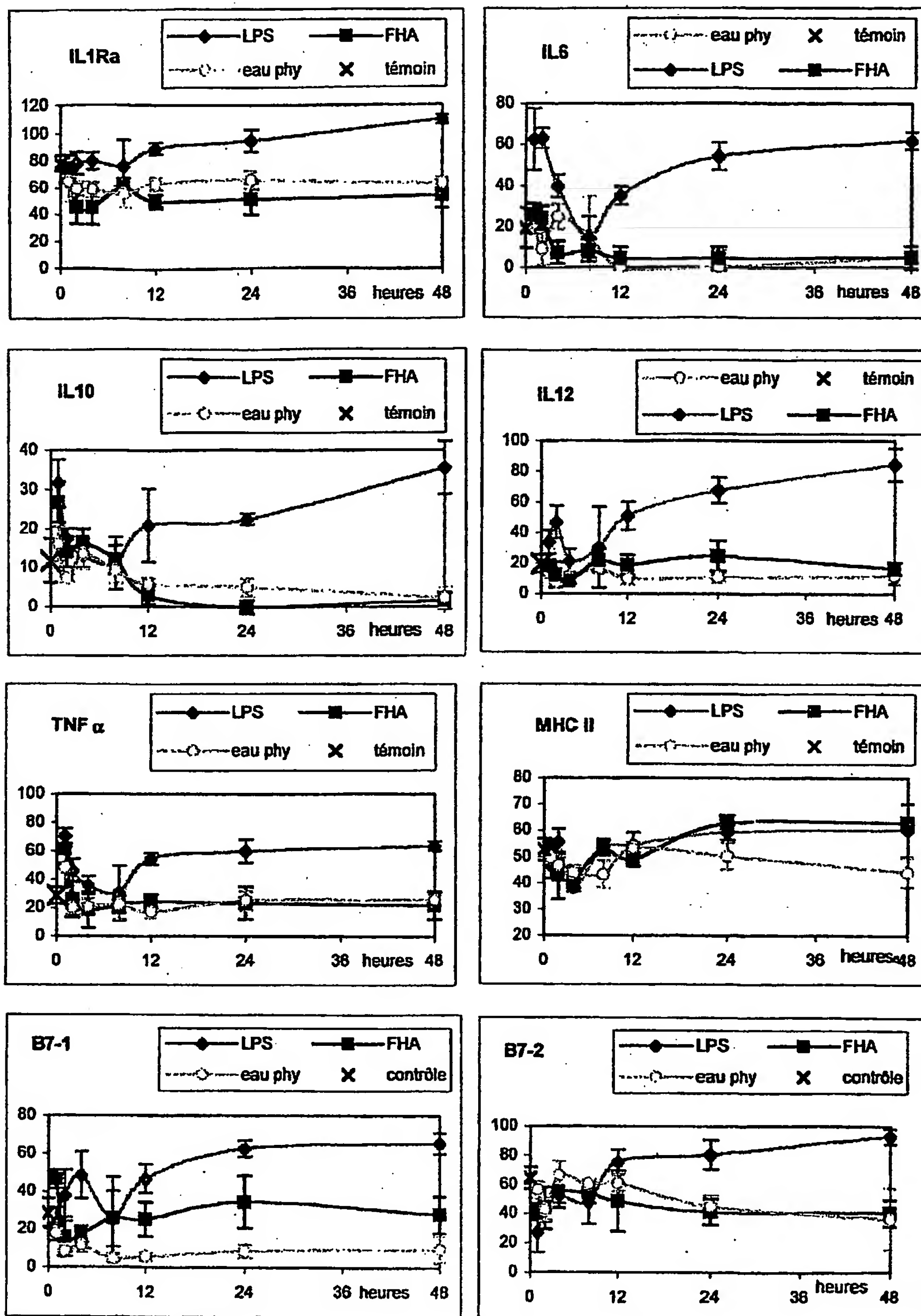


Fig. 9